

# カチオン性リポソーム・プラスミド DNA 複合体と血清成分の相互作用に関する研究

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 吉川 直樹

## [目的]

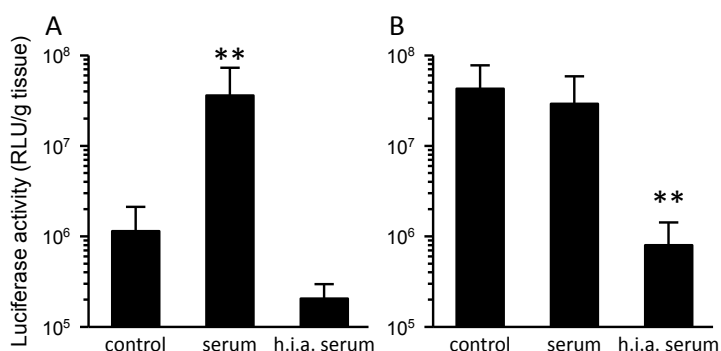
遺伝子治療は、疾患の元となる遺伝子レベルの異常を標的とした原因治療であり、がんなどの難治性疾患や先天性遺伝子欠損症の治療法として期待されている。遺伝子治療は遺伝子の欠損や変異を外来遺伝子の導入により行い、遺伝子導入に用いられるベクターはウイルス性ベクターと非ウイルス性ベクターに分類される。安全性や改変の容易さから、非ウイルス性ベクターに対する期待が高く、代表的なベクターとしてカチオン性リポソーム・プラスミド DNA (pDNA) 複合体の研究が活発に行われている。複合体の生体への適用に関しては、投与方法の一つとして血管内投与が有望とされている。しかし、複合体は表面が正に帯電しており、血管内投与後はアニオン性の血中成分と相互作用することが考えられる。複合体と血中成分との相互作用についてはこれまでも研究されているが、巨視的な情報に留まっており、複合体を用いた安全な遺伝子治療を行う上では不十分である。

生体への遺伝子導入技術の進歩のためには、ベクターが血中成分から受ける影響について、より詳細な情報を得る必要がある。そこで本研究では、血中成分の中でも様々な生理学的機能を有する成分が含まれる血清成分に着目し、遺伝子導入における血清成分の寄与について解析した<sup>1,2)</sup>。

## [結果・考察]

### I. カチオン性リポソーム・プラスミド DNA 複合体の血管内投与による肝臓および肺への遺伝子導入における血清成分の役割

複合体と血清成分を予め混合した上でマウスに血管内投与し、遺伝子発現を解析することにより、血清成分との相互作用が遺伝子導入に及ぼす影響を評価した。血清と相互作用することで、複合体を門脈内に投与後の肝臓での遺伝子発現が増大した (Fig. 1A)。また、静脈内投与後の肺での遺伝子発現レベルは対照群と変わらなかった (Fig. 1B)。しかしながら、加熱処理により



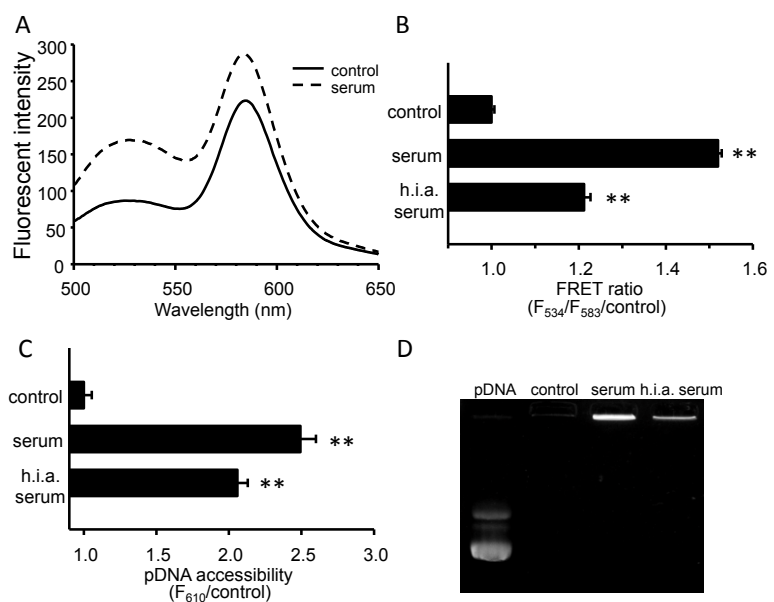
**Fig. 1** Effect of interaction between complex and serum on hepatic (A) or pulmonary (B) transgene expression after intraportal (A) or intravenous (B) injection of complex in mice.

Complex was incubated with 5% glucose (control), serum, or heat-inactivated serum (h.i.a. serum) for 5 min before intravenous injection. Each bar represents the mean + SD of at least nine experiments. \*\* $p < 0.01$  vs. control.

非働化した血清では遺伝子発現レベルが低下した。従って、複合体の血管内投与による遺伝子導入において、血清との相互作用は重要な過程であると考えられる。また、複合体の凝集を回避するためには、血清中に一定のタンパク質量が必要であることを見出した。さらに、血清中からカルシウムイオンを除去することで遺伝子発現が低下すること、fibronectin と相互作用することで遺伝子発現が増大することが示された。また、fibronectin は組織中の細胞表面に発現しているインテグリンと相互作用することで遺伝子導入に寄与していることが示された。これらのことから、複合体の血管内投与による遺伝子導入には血清中の複数の成分が関与していると考えられる。

## II. 血清成分との相互作用によるカチオン性リポソーム・プラスミド DNA 複合体の粒子特性変化

複合体の血管内投与による遺伝子導入において、血清との相互作用が重要であることが示唆された。ここで、複合体は血清成分と相互作用することにより粒子特性に影響を受ける可能性が考えられる。血清成分と相互作用させた複合体の粒子径変化を解析したところ、遺伝子導入に寄与する成分が粒子径を増大させることが示され、遺伝子導入への寄与には粒子径増大が重要である可能性が示唆された。複合体の構造に及ぼす影響を解析するため、蛍光共鳴エネルギー移動を用いて脂質膜融合を評価した結果、血清との相互作用は膜融合を顕著に誘導した (Fig. 2AB)。また、ethidium bromide の pDNA へのインターカレーションを利用して複合体の構造弛緩を評価した結果、血清との相互作用は複合体構造を顕著に弛緩させた (Fig. 2C)。さらに、複合体の構造変化には、タンパク質量の補充成分として用いた、血清からアニオン性成分を除いた QF 分画の寄与が大きいことが示された。血清との相互作用により複合体構造は弛緩したが、複合体からの pDNA の解離は確認されなかった (Fig. 2D)。Fibronectin と複合体の相互作用に関して、既報より fibronectin はリポソームではなく pDNA と結合する可能性も示唆されており (Proteomics 11, 3349-3358 (2011))、そのメカニズムとして複合体の構造弛緩が重要であると考えられる。



**Fig. 2** Effect of interaction of complex with serum on complex stability. (A) Mean spectra of control and serum-treated complex. (B) Relative efficiency of membrane fusion during interaction of complex with serum components. (C) Structural relaxation of complex during interaction with serum components. Each bar represents the mean + SD of three experiments. \*\* $p < 0.01$  vs. control. (D) Agarose gel electrophoresis of complex interacting with serum components. No dissociation of pDNA during interaction with serum components.

### III. カチオン性リポソーム・プラスミド DNA 複合体の静脈内投与時における肺への遺伝子導入のメカニズム解析

血清成分と相互作用することで複合体の粒子特性の変化がみられたが、さらに血管内投与後の複合体の体内分布や生体反応にも変化を生じることが考えられる。そこで、血清成分が遺伝子導入に寄与するメカニズムを解明することを目的として、複合体を静脈内投与後の生体内での挙動に及ぼす血清成分の影響を解析した。複合体のみ、および血清あるいは非働化血清と相互作用させた複合体を静脈内に投与後、複合体の肺蓄積量を測定した結果、血清と相互作用した複合体は対照群とほぼ同様の経時変化を示した (Fig. 3)。一方、非働化血清と相互作用した複合体の肺蓄積量は顕著に低下し、その差は投与 2 分後の段階で明確に現れた (Fig. 3)。さらに、肺への遺伝子導入に寄与する血清成分であるカルシウムイオンや fibronectin と相互作用することで、複合体の肺蓄積が増大した。従って、複合体を静脈内に投与後の肺への遺伝子導入には複合体の肺蓄積が重要であると考えられる。また、カルシウムイオンや fibronectin は粒子径を増大させることから、複合体の肺蓄積には粒子径が重要であると仮説を立て、粒子径が異なるように様々な条件で調製した複合体を用いて、肺蓄積および肺での遺伝子発現を解析した。その結果、粒子径が大きい複合体ほど肺蓄積量が多く、肺での遺伝子発現が高いことが示された。以上の結果から、複合体は静脈内投与後、血清成分と相互作用することで粒子径が増大し、肺に蓄積することで遺伝子導入に至っていると推察される。

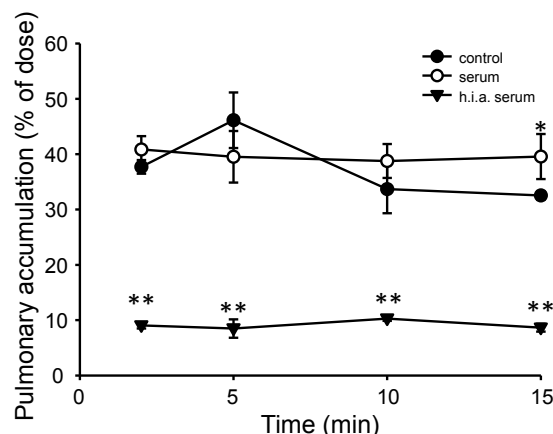


Fig. 3 Effect of interaction between complex and serum on pulmonary accumulation of complex after intravenous injection in mice.

Complex was incubated with 5% glucose (control), serum, or heat-inactivated serum (h.i.a. serum) for 5 min before intravenous injection. Each symbol represents the mean  $\pm$  SD of three experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. control.

#### [結論]

カチオン性リポソーム・pDNA 複合体の血管内投与による遺伝子導入において、血清成分との相互作用が重要であることを示し、カルシウムイオン、血清中のタンパク質量および fibronectin が特に重要であることを見出した。さらに、これらの成分が肺への遺伝子導入に寄与するメカニズムに関して、複合体の粒子径と組織蓄積量が重要であることを明らかにした。本研究で得られた知見は、新たな遺伝子導入キャリアの開発やキャリアの安全な使用など、生体への遺伝子導入技術の進歩につながる有益な情報であると思われる。

#### [基礎となった学術論文]

- 1) Yoshikawa N, Sakamoto K, Mizuno S, Sakaguchi J, Miyamoto H, Mine T, Sasaki H, Fumoto S, Nishida K, *J. Gene Med.* **13**, 632-643 (2011)
- 2) Yoshikawa N, Fumoto S, Nakashima M, Shimokawa K, Miyamoto H, Nishida K, *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 1807-1813 (2013)